

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

15.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 5 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 5 5 5 0 5
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 5 5 5 0 5]

出 願 人 独立行政法人科学技術振興機構
Applicant(s): 独立行政法人産業技術総合研究所

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

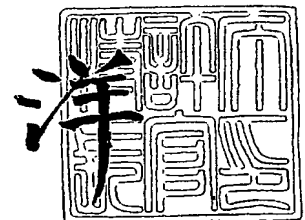
REC'D 02 DEC 2004

WIPO PCT

2 0 0 4 年 1 1 月 1 8 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P03-0669
【提出日】 平成15年10月15日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61L 27/00
C12N 15/09

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市吾妻 3 - 1 8 - 3 ルミエール吾妻 1 0 1
【氏名】 小島 弘子

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 植村 寿公

【特許出願人】
【識別番号】 503360115
【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100096183
【弁理士】
【氏名又は名称】 石井 貞次

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】
【識別番号】 100119183
【弁理士】
【氏名又は名称】 松任谷 優子

【持分の割合】 75/100

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 015244
【納付金額】 15,750円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラント。

【請求項 2】

骨・軟骨誘導性転写因子が、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis及びSox-9 からなる群より選ばれる 1 種又は 2 種以上である、請求項 1 に記載のインプラント。

【請求項 3】

骨・軟骨誘導性転写因子がCbfa1である、請求項 1 に記載のインプラント。

【請求項 4】

生体適合性材料が、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体からなる群より選ばれるいずれかである、請求項 1～3 項のいずれか 1 項に記載のインプラント。

【請求項 5】

生体適合性材料が β -TCPである、請求項 4 に記載のインプラント。

【書類名】明細書

【発明の名称】転写因子を利用した骨・軟骨再生用インプラント

【技術分野】

【0001】

本発明は、転写因子を利用したインプラントに関する。より詳しくは、転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを生体内で徐放させ、転写因子活性を持続的に発現させることにより、良好な骨・軟骨再生を可能にするインプラントに関する。

【背景技術】

【0002】

骨は再生能力の限られた組織であり、その修復には自家骨の再移植や人工インプラントによる置換・補充が必要となる。しかし、自家骨の使用は患者の負担が大きく、その採取量にも限界がある。また、人工インプラントには、生体骨に匹敵するだけの強度や機械的特性、生体適合性が期待できないという問題がある。

【0003】

これに対し、生体から取り出した自己の細胞をin vitroで培養・組織化して限りなく生体に近い組織を再構築し、これを再び生体内に戻すという再生医療の研究が進められている。この研究が実現すれば、それは損傷組織に対する最も理想的な治療方法となる。

【0004】

再生医療においては、生体外で細胞をより早く目的の組織に増殖・分化させること、また移植組織を速やかに欠損部に融合・組織化させることが、重要な問題となる。これを解決する方法として、細胞の分化誘導をつかさどるサイトカイン(液性因子)を直接細胞に導入するいくつかの技術が知られている。たとえば、TGF- β 1を含浸させたコラーゲンスポンジ上で骨髄細胞等を培養する技術(例えば、特許文献1参照)、bFGFを含有するコラーゲン-軟骨細胞複合体による軟骨組織再生治療材(例えば、特許文献2参照)等が公知である。しかし、増殖因子そのものを細胞に添加する方法では、添加した増殖因子が速やかに拡散してしまうため、増殖因子活性の十分な持続が望めないという問題がある。一方、リポフェクション法により増殖因子の遺伝子を細胞に導入する方法も試みられているが、この方法は樹立細胞株ではある程度の成功をおさめても、初代培養細胞に対しては殆ど0に近い導入効率しか得られていない。

【0005】

最近、骨芽細胞の分化には転写因子、特にrunt型及びHelix-Loop-Helix(HLH)型の転写因子が重要な意味を持つことが、多くの研究者により明らかにされてきた。例えばrunt型転写因子としては、Pebp2alphaA(Pebp2 α A)/Cbfa1、HLH型転写因子としては、Scleraxis、Id-1、I-mfa等が骨芽細胞分化に重要な意味を持つことが報告されている(例えば、非特許文献1～6参照)。そして、発明者らは、この転写因子(Cbfa1)遺伝子を導入した骨芽細胞を β -TCP等の生分解性材料を足場として培養、組織化し(例えば、非特許文献7及び8参照)、生体に移植することで、良好な骨・軟骨組織再生が可能になることを報告している(例えば、特許文献3参照)。この方法は、効率の良い骨・軟骨再生を可能にするという点においては非常に優れた技術である。しかし、患者体内からの細胞の単離、生体外での組織構築、生体内への再移植という工程は、現実の臨床適用においては決して容易ではない。

【0006】

【特許文献1】特開2001-316285号

【特許文献2】特開平8-3199号

【特許文献3】国際公開第03/011343号パンフレット

【非特許文献1】Komori, T. et al., (1997) Cell 89, p755-764

【非特許文献2】Acampora, D. et al., (1999) Development 126, p3795-3809

【非特許文献3】Tribioli, C. et al., (1999) Development 126, p5699-5711

【非特許文献4】Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet. 24, p391-395

【非特許文献5】Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, p1099-1110

【非特許文献 6】 Ng, L.J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, p108-121

【非特許文献 7】 H. Kojima, T. Uemura, (2002) Molecular Biology of the Cell, Vol. 13 supplement, p543a

【非特許文献 8】 Toshimasa Uemura, Hiroko Kojima, (2002) Tissue Engineering, Vol. 8, No. 6, p1129

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、整形外科領域及び歯科領域における、より簡便かつ安全な骨・軟骨再生の手段を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討し、 β -TCP やハイドロキシアパタイト等の生体適合性材料を用いて生体内で転写因子の遺伝子導入用ウイルスベクターを徐放させる方法を見出した。そして、この方法によれば、低濃度のウイルスベクターでも転写因子の遺伝子を導入した細胞を移植する方法と同等の骨・軟骨再生が可能になることを実証し、本発明を完成させた。

【0009】

すなわち、本発明は骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したアデノウイルスベクター又はレトロウイルスベクターを含む生体適合性材料からなる骨・軟骨再生用インプラントに関する。

【0010】

本発明のインプラントにおいて、骨・軟骨誘導性転写因子としては、例えば、Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis及びSox-9 から選ばれる 1 種又は 2 種以上を利用することができる。なかでも、Cbfa1が好ましい。

【0011】

また、本発明のインプラントにおいて、生体適合性材料としては、例えば、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸、ならびにこれらの 2 種以上で構成される複合体から選ばれるいずれかを利用することができる。なかでも、 β -TCP が好ましい。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、生体内で骨・軟骨再生を促す転写因子活性が長期的に発現され、損傷を受けた骨・軟骨の良好な再生が可能になる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明について詳細に説明する。

1. インプラント

本発明は、骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を組み込んだウイルスベクターを含む生体適合性材料からなるインプラントに関する。該インプラントは、歯槽骨再生や大腿骨再生など、歯科領域及び整形外科領域における骨・軟骨再生に用いられる。

【0014】

1. 1 転写因子

本発明に用いられる転写因子は、未分化の細胞を骨及び／又は軟骨に分化誘導する、骨・軟骨誘導性の転写因子であり、例えばCbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9 が挙げられる。Cbfa1は1993年京都大学の小川らによってクローニングされ、大阪大学の小守らにより間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化誘導するのに必要不可欠であることが確認された転写因子である (Komori, T. et al., (1997) Cell 89, 755-764)。このCbfa1には 2 つのアイソフォーム、*tlx-1* と *pebp2 α A* が存在する。Dlx-5は、*Drosophila distalles* (*Dll*) 遺伝子の相同遺伝子で、軟骨骨膜や内膜の骨化に関わる転写因子である (Acampo

ra, D. et al., (1999) Development 126, 3795-3809)。Bapx1は、Drosophila bagpipe homeobox遺伝子の相同遺伝子で、特に脊髄における間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化に関わっており、Cbfa1遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている (Tribioli, C. et al., (1999) Development 126, 5699-5711)。Msx2は、Drosophila muscle segment homeobox (Msh) 遺伝子の相同遺伝子で頭蓋骨の骨化に関わっており、Cbfa1遺伝子の調節遺伝子の1つと考えられている (Satokata, I. et al., (2000) Nature Genet. 24, 391-395)。Scleraxisは、間葉系幹細胞から軟骨細胞や結合組織への分化誘導に関わる転写因子である (Cserjesi, P. et al., (1995) Development 121, 1099-1110)。Sox-9は、軟骨で発現しており、type II Collagen等の軟骨分化に関わる遺伝子の発現調節をしている (Ng, L. J. et al., (1997) Dev. Biol. 183, 108-121)。

【0015】

本発明で用いられる転写因子の由来は特に限定されないが、移植の対象となる哺乳動物に由来する転写因子を用いることが好ましい。したがって、ヒトを対象とした骨・軟骨再生においては、ヒト由来の転写因子を用いることが好ましく、マウスを対象とした骨・軟骨再生においては、マウス由来の転写因子を用いることが好ましい。

【0016】

本明細書中において、前記Cbfa1、Dlx-5、Bapx1、Msx2、Scleraxis、Sox-9等の骨・軟骨誘導性転写因子には、そのすべてのオースログを含むものとする。ここで「オースログ (Ortholog)」とはオースログス遺伝子 (orthologous gene) のことであり、進化的に同じ起源をもち構造と機能が類似した異なる種の遺伝子を意味する。これらの遺伝子の塩基配列は既に公知であり、GenBank等の公共データベースよりその情報を入手することができる。例えば、マウス骨芽細胞由来Cbfa1遺伝子の塩基配列は、Accession No. AF010284、AF005936等としてGenBankに登録されている。また、ヒトCbfa1の塩基配列は、Accession No. AH005498、NM004348、L40992等として、GenBankに登録されている。その他、ヒトDlx-5はAccession No. AK023493として、ヒトBapx1はAccession No. NM_001189として、ヒトMsx2はAccession No. D31771として、ヒトScleraxisはAccession No. BK000280として、ヒトSox-9はAccession No. Z46629として、それぞれGenBankに登録されている。

【0017】

本発明で用いられる骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子は、上記配列情報を利用して常法により調製することができる。すなわち、骨芽細胞から全RNA又はmRNAを抽出し、公知の配列を基に作製したプライマーを用いて、PCR法により目的とする転写因子のcDNAを増幅する。

【0018】

1. 2 ウイルスベクターの作製

前記アデノウイルス又はレトロウイルスベクターは、周知の方法に基づいて調製することができる。例えばアデノウイルスベクターは、Miyakeらの方法 (Miyake, S. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1320-1324, (1993)) に基づいて調製することができる。ベクターはまた、市販のキット、例えばAdenovirus Cre/loxP Kit (宝酒造社製) 等を用いて作製してもよい。このキットは、P1ファージのCreリコンビナーゼとその認識配列であるloxPを用いた発現制御系 (Kanegae Y. et.al., 1995 Nucl. Acids Res. 23,3816) による組換えアデノウイルスベクター作製用キットで、目的の転写因子遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを簡便に作製することができる。なお、アデノウイルス感染の moi (multiplicity of infection) は、10以上、好ましくは50~200、より好ましくは100前後 (80~120程度) である。

【0019】

1. 3 生体適合性材料

本発明で用いられる生体適合性材料とは、生体内に適用可能な材料であれば特に限定されず、例えば、ハイドロキシアパタイト、 α -TCP、 β -TCP、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、及びポリグリコール酸等を挙げることができる。これらの材料は1種類であってもよいし、あるいは2種以上を組み合わせた複合体であってもよい。

【0020】

前記生体適合性材料は、ウイルスベクターの吸着が可能のように、有効吸着表面積が大きい多孔性（または微粒子の集合体）であることが望ましい。なお、本明細書中において「多孔(性)」とは、気孔率が少なくとも30%以上であることを意味するものとする。本発明の生体適合性材料において気孔の大きさは特に限定されないが、直径 $50\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ 程度であることが好ましい。一方、骨のような硬組織用インプラントでは、初期強度も重要となる。セラミックス多孔体ではハイドロキシアパタイトや β -TCPは強度が高く、本発明の生体適合性材料として好ましい。さらに、生体適合性材料は骨再生後に生体内で分解吸収されることがより好ましい。

【0021】

β -TCPはある程度の強度を有する生分解性セラミックス多孔体という点で、本発明にかかる生体適合性材料として特に好ましい。多孔性 β -TCPの圧縮強度は3Mパスカル程度で、生体骨（海綿骨で7Mパスカル程度）よりは弱いものの、臨床使用には十分な強度といえる。さらに、 β -TCPは生体内で徐々に分解してカルシウムイオンとリン酸イオンを放出し、骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が容易な環境を実現する。すなわち、 β -TCPから放出されたカルシウムイオンとリン酸イオンを利用して、周囲の骨芽細胞によるハイドロキシアパタイト合成が可能になる。合成されたハイドロキシアパタイトは骨の構成成分として、やがて硬い骨へと置換していく。実際、本発明のように転写因子の遺伝子を導入したウイルスベクターを吸着させ、周囲が骨をつくるのに適した環境であれば、 β -TCPの分解部位にハイドロキシアパタイトを主成分とした新生骨が容易に構成される。つまり、 β -TCPはウイルスデリバリーの担体や骨形成の足場としてだけでなく、それ自体が骨新生を積極的に促進させる機能を有する。

【0022】

1. 4 生体適合性材料へのベクターの組み込み

生体適合性材料へのベクターの組み込み方法は特に限定されないが、できる限り均一に組み込まれることが好ましい。ベクターは前記生体適合性材料に化学的に結合されていてもよいし、単に物理的に吸着されているだけでもよい。例えば、 β -TCPの場合であれば、ベクターを含む溶液（培地）に浸漬させることにより、 β -TCP中にベクターを均一に吸着させることができる。必要であれば、ベクターを含む溶液が生体適合性材料内に十分いきわたるよう、適宜減圧してもよい。例えば、 $1\times 10^8\sim 10^9$ pfu/mlの濃度のウイルスベクター液を血清の含有されていない適当な溶媒（例えば、生理食塩水等）又は培地で希釈し、そこに生体適合性材料からなるブロックを浸漬する。100～150 mmHgに減圧してブロック内を脱気し、ブロック内にウイルスベクター液を十分浸透させる。

【0023】

ベクターを吸着させた生体適合性材料は、好ましくは数時間以内に生体内に移植する。本発明の生体適合性材料は、生体内に埋入あるいは注入されると、骨再生に必要とされる期間にわたり、徐々に転写因子の遺伝子を導入したウイルスベクターを放出する。かくして、良好な骨再生が可能となる。

【0024】

1. 5 その他

本発明のインプラントの形態及び形状は、特に限定されず、スポンジ、メッシュ、不織布状成形物、ディスク状、フィルム状、棒状、粒子状、及びペースト状等、任意の形態及び形状を用いることができる。また、本発明のインプラントは他の材料と混合して用いても良い。例えば、ウイルスを吸着させた β -TCPの顆粒をハイドロキシアパタイトの顆粒と混合して骨補填剤として使用することができる。こうした形態や形状は、インプラントの目的に応じて適宜選択すればよい。

【0025】

本発明のインプラントは、その目的と効果を損なわない範囲において、骨・軟骨組織及び足場材料のほか、適宜他の成分を含んでもよい。そのような成分としては、例えば、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、血小板分化増殖因子（PDGF）、インスリン、イン

スリン様増殖因子 (IGF)、肝細胞増殖因子 (HGF)、グリア誘導神経栄養因子 (GDNF)、神経栄養因子 (NF)、ホルモン、サイトカイン、骨形成因子 (BMP)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 等の増殖因子、骨形成タンパク質、St、Mg、Ca及びCO₃等の無機塩、クエン酸及びリン脂質等の有機物、薬剤等を挙げることができる。

【0026】

本発明のインプラントは、骨親和性が高く、生体適用後すみやかに生体骨と一体化し、骨欠損部の再生を可能にする。

【実施例】

【0027】

実施例1：生体適合性材料を担体としたウイルスベクターの徐放
研究方法：

1. アデノウイルスベクターの作製

マウスの骨芽細胞から単離したTotal RNAからAMV reverse transcriptaseを用いてcDNAを合成し、これを鋳型としてCbfalのcDNA (GenBank Accession No. AF010284：配列番号1) に特異的なプライマーを用いてPCRによりcbfal cDNAを増幅して得た。

sense primer 5'-ATGCTTCATTCGCCTCACAAAC-3' (配列番号2)

antisense primer 5'-TCTGTTTGGCGCCATATTGA-3' (配列番号3)

【0028】

Cbfal cDNAはTA cloning vector (Invitrogen, pCR II-TOPO) にクローニングして大量調製した。Cbfal cDNAを制限酵素のSpe IとEcoR Vで切り出し、平滑末端化した後、Adenovirus Cre/loxP kit (宝酒造, 6151) を用いてコスミドベクターpAxCALNLwのSwa Iサイトに挿入し、Kitの説明書に従って組換えアデノウイルスを作製した。作製したウイルスの力価は、約10¹¹ PFU/mlの値を示し、感染効率は非常に高いことが確認された。

【0029】

2. 骨芽細胞の採取及び培養方法

Rat Bone Marrow Osteoblast (RBM0) は、6週齢のFisherラット (雄) の大腿骨よりManiatisら (Maniatis, C., Sodek, J., and Melcher, A. H. (1988) Cell Tissue Res. 254, 317-330) の方法に従って採取した。細胞は、15% FBS (Sigma, F-9423)、Antibiotic-Antimycotic (GIBCO BRL, 15240-062) 添加MEM培地 (nacalai tesque, 214-42) で約1週間培養した。その後2日間10 nM Dexamethasone、10mM β -glycerophosphate、5 μ g/ml vitamin C phosphateを添加した上記の培地で培養した。

【0030】

3. ラット生体内移植実験

3.1 ラット背上皮皮下移植実験

CbfalとCreリコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1 \times 10⁹ pfu/ml) に β -TCPブロック (Olympus, 2 mm \times 2 mm \times 2 mm) を3時間浸漬した。RBM0をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を100万個/mlに調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの背上皮皮下にウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。3週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン/エオジン染色して観察した。図1にラット背上皮皮下移植実験の概要を示す。

【0031】

3.2 ラット大腿骨欠損部位移植実験

1) CbfalとCreリコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1 \times 10⁹ pfu/ml) に β -TCPブロック (Olympus, 2 mm \times 2 mm \times 2 mm)、あるいはハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア, 2 mm \times 2 mm \times 2 mm) を3時間浸漬した。ラットの大腿骨にドリルで2.5 mm立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこにブロックを移植した。数週間後に摘出したウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックをヘマトキシリン/エオジン染色して観察した。

【0032】

2) Cbfa1とCreリコンビナーゼ遺伝子の組換えアデノウイルス混合液 (1×10^9 pfu/ml) に β -TCPブロック (Olympus, 2 mm \times 2 mm \times 2 mm)、あるいはハイドロキシアパタイト (HA) ブロック (インターポア、2 mm \times 2 mm \times 2 mm) を3時間浸漬した。RBM0をトリプシン処理して剥がした後、細胞濃度を100万個/mlに調整して減圧下 (100mHg) でブロックに吸着した。ラットの大腿骨にドリルで2.5 mm立方の穴を開けて欠損部位を作製し、そこにウイルス吸着ブロックあるいは未処理のブロックを移植した。数週間後に摘出したブロックをヘマトキシリン/エオジン染色して観察した。図3にラット大腿骨欠損部位移植実験の概要を示す。

【0033】

4. 組織切片作製、染色法

摘出したブロックを4% paraformaldehyde, 0.05% glutaraldehydeでマイクロウェーブ固定し、翌日10% EDTA, 100 mM Tris (pH7.4) 中で約1週間脱灰した。脱灰後、エタノールで脱水し、パラフィンに包埋した。5 μ mの厚さの切片を作製し、脱パラフィン後、ヘマトキシリン続いてエオジンで染色した。

【0034】

結果:

1. ラット背上皮皮下移植実験結果

図2に、背上皮皮下移植3週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。ウイルス吸着ブロックの方はブロックの中心部分で(図2右上、右下)骨が再生されている様子が観察できた。一方未処理のブロックの方では骨芽細胞様細胞は観察されるが骨化は進行していなかった(図2左下)。

【0035】

2. ラット大腿骨欠損部位移植実験結果

1) β -TCPブロック (移植後2週間)

図4に、 β -TCPブロック大腿骨欠損部位移植2週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。Cbfa1遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方が、ブロックのポアの溶解が進行しており、ポアの周囲の骨化も進行していることが観察された(図4左下、右下)。骨芽細胞を添加した方は添加していないものに比べて、若干ブロックの溶解及び骨化が進んでいるように見えた(図4右下)。Cbfa1遺伝子組み換えウイルスを吸着することで、骨再生を迅速に誘導できることが確認された。

【0036】

2) β -TCPブロック (移植後6週間)

図5に、 β -TCPブロック大腿骨欠損部位移植6週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。Cbfa1遺伝子組み換えウイルス吸着ブロックの方がブロックの溶解が進行しており、また骨化の進行も顕著であった。特に皮質骨部位における迅速な骨再生と、骨髓腔における速やかなブロックの消失が観察された(図5左下、右下)。骨芽細胞を添加した方が、骨・骨髓再生の進行状況から判断して、Cbfa1遺伝子の導入効果が若干強く現れることが観察できた(図5右下)。

【0037】

3) HAブロック (移植後3週間)

図6に、HAブロック大腿骨欠損部位移植6週間後のヘマトキシリン/エオジン染色結果を示す。 β -TCPブロックに比べて本実験で用いたHAブロックは、ポアサイズも気孔率も非常に高く、ウイルスの吸着する表面積が小さくなるため、ウイルス吸着の影響が顕著ではない。またHAは生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内に残存し続けると考えられた。

【0038】

4) β -TCPブロックとHAブロックの比較 (移植後3週間)

図7に、移植後3週間で摘出したHAブロックと β -TCPブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。HAブロックに比べて生分解性のセラミックス材料である多孔性 β -TCPブロックの方が、骨・骨髓再生を促進させることがわかった。効果は特に皮質骨部分で顕著に

認められる。 β -TCPブロックの場合、移植後ウイルスが生体内で徐々に拡散されるため、ブロック周囲に存在する骨髄にも影響を与えて骨再生を促すものと考えられた。

【0039】

5) ウイルス吸着ブロックとウイルス感染細胞吸着ブロックの比較（移植後8週間、 β -TCPブロック）

図8に、移植後8週間で摘出したウイルス吸着ブロックとウイルス感染細胞吸着ブロックの骨再生の様子を比較した結果を示す。ウイルス感染細胞吸着ブロックに比べてウイルス吸着ブロックは、骨髄腔のブロックの溶解、骨髄への置換は若干劣るが、皮質骨部分の骨化の進行は同等、及びそれ以上に早いことが観察された。

【0040】

考察:

生体適合性材料である多孔性 β -TCP及びハイドロキシアパタイト (HA) にCbfa1のcDNAを組み込んだウイルスベクターを吸着させ、生体内に移植してCbfa1遺伝子組み換えウイルスを徐放させることにより、骨・骨髄再生が促進できることが確認された。また、骨・骨髄再生の進行状況から判断して、Cbfa1遺伝子導入用ウイルスベクターを吸着させた β -TCPブロックは、Cbfa1遺伝子を導入した骨芽細胞を吸着させた β -TCPブロックと同等の骨再生効果を有すると考えられた。

【0041】

HAブロックは β -TCPブロックに比べてポアサイズも気孔率も非常に高く、結果的にウイルスが吸着する表面積が小さいと考えられる。そのためウイルス吸着の影響が β -TCPブロックほど顕著には確認できなかった。しかしながら、HAブロックの染色像で皮質骨の部分に着目すると、ウイルス吸着担体の方がより良好に骨再生が促進されていることがわかる。 β -TCPとは異なり、HAは生分解性材料ではないため、欠損が修復された後も体内に残存し続けるという問題はあるものの、本発明のインプラント材料として使用しうることが確認された。

【0042】

ラットのようなげっ歯類は一般にアデノウイルスに感染しにくいと、ヒトの十倍以上の濃度を使用する必要があるといわれている。例えば、直接体内へ導入する場合、 10^8 から 10^{10} pfuのウイルスを注射するという (Okubo et al., Life Science (2001) vol 70(3): 325-36, Trudel et al., Cancer Gene Therapy (2003), vol 10(10): 755-763, Hedman et al., Circulation (2003), vol 107 (21): 2677-2683)。本実施例では、 10^9 pfu/mlのウイルス液1 mlに2 mm立方のブロックを10~20個程度浸漬しているため、体内に導入されるウイルス量は 10^9 pfuよりさらに少ない。また、本発明の方法では、注射等による直接導入と異なり、ウイルスはブロックに吸着されているため、生体内移植後に血流に乗って拡散する可能性も低い。すなわち、本試験により、本発明の方法はより低濃度で効果的な骨軟骨再生を可能にすることが確認された。

【産業上の利用可能性】

【0043】

本発明によれば、より安全かつ簡便な骨・軟骨再生が可能となる。本発明のインプラントは、歯科領域あるいは整形外科領域における安全かつ簡便な骨・軟骨再生手段として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】図1は、ラット背上皮皮下移植実験の方法を示した模式図である。

【図2】図2は、ラット背上皮皮下移植実験におけるヘマトキシリン/エオジン染色像（移植後3週間、背上皮皮下）を示す写真である。

【図3】図3は、ラット大腿骨欠損部位移植実験の方法を示す模式図である。

【図4】図4は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後2週間、 β -TCPブロック）を示す写真である。

【図5】図5は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオジン

染色像（移植後6週間、 β -TCPブロック）を示す写真である。

【図6】図6は、ラット大腿骨欠損部位移植実験におけるヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後3週間、HAブロック）を示す写真である。

【図7】図7は、ラット大腿骨欠損部位移植後の β -TCPブロックとHAブロックのヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後3週間）を示す写真である。

【図8】図8は、ラット大腿骨欠損部位移植後のウイルス吸着ブロックとウイルス感染細胞吸着ブロックのヘマトキシリン-エオジン染色像（移植後8週間、 β -TCPブロック）を示す写真である。

【配列表フリーテキスト】

【0045】

配列番号2—人工配列の説明：Cbfa1増幅用センスプライマー

配列番号3—人工配列の説明：Cbfa1増幅用アンチセンスプライマー

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Japan Science and Technology Agency

<120> Implant for regeneration of bone/cartilage tissue by using transcription factor

<130> P03-0669

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1791

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<400> 1

```
atgcttcatt cgcctcacia acaaccacag aaccacaagt gcggtgcaaa ctttctccag 60
gaagactgca agaaggctct ggcggtttaaa tgggttaatct ctgcaggtca ctaccagcca 120
ccgagaccaa ccgagtcatt taaggctgca agcagtatatt acaacagagg gcacaagttc 180
tatctggaaa aaaaaggagg gactatggcg tcaaacagcc tcttcagcgc agtgacaccg 240
tgtcagcaaa gcttcttttg ggatccgagc accagccggc gcttcagccc cccctccagc 300
agcctgcagc ccggcaagat gagcgacgtg agcccgggtg tggctgcgca gcagcagcaa 360
cagcagcagc agcagcagca acagcagcag caacaacagc aacagcaaca acagcagcag 420
cagcagcagc agcaggaggc ggccgcagca gcagcggcgg cagcggcggc ggcagcagcg 480
gcggcgggcg cagtgcctcg attgaggccg ccgcacgaca accgcaccat ggtggagatc 540
atcgcgggacc acccggccga actggctccg accgacagtc ccaacttcct gtgctccgtg 600
ctgccctcgc actggcggtg caacaagacc ctgcccgtgg ctttcaaggt ttagacctc 660
ggagaggtac cagatgggac tgtggttacc gtcattggcg ggaatgatga gaactactcc 720
gccgagctcc gaaatgcctc cgctgttatg aaaaaccaag tagccagggt caacgatctg 780
agatttgtgg gccggagcgg acgaggcaag agtttcacct tgaccataac agtcttcaca 840
aatcctcccc aagtggccac ttaccacaga gctattaaag tgacagtgga cgggtccccg 900
gaaccaagaa ggcacagaca gaagcttgat gactctaaac ctagtttgtt ctctgatcgc 960
ctcagtgatt tagggcgcat tctcatccc agtatgagag taggtgtccc gcctcagaac 1020
ccacggccct ccctgaactc tgcaccaagt ctttttaatc cacaaggaca gactcagatt 1080
acagatccca ggcaggcaca gtcttcccca ccgtggtcct atgaccagtc ttaccctcc 1140
tatctgagcc agatgacatc ccatccatc cactccacca cgccgctgtc ttccacacgg 1200
ggcaccgggc tacctgccat cactgacgtg cccaggcgta ttccagatga tgacactgcc 1260
acctctgact tctgcctctg gccttctctc ctcagtaaga agagccaggc aggtgcttca 1320
gaactggggc ctttttcaga cccaggcagc ttccaagca tttcatccct cactgagagc 1380
cgcttctcca acccacgaat gcaactacca gccaccttta cctacacccc gccagtcacg 1440
tcaggcatgt ccctcgcat gtccgccacc actcactacc acacgtacct gccaccaccc 1500
taccctggct cttcccaaag ccagagtgga cccttccaga ccagcagcac tccatatctc 1560
```

tactatggta cttcgtcagc atcctatcag ttcccaatgg taccggggg agaccggtct 1620
ccttcaggga tgggtcccacc atgcaccacc acctcgaatg gcagcacgct attaaatcca 1680
aatttgccta accagaatga tgggtgttgac gctgacggaa gccacagcag ttccccaact 1740
gttttgaatt ctagcggcag aatggatgag tctgtttggc ggccatattg a 1791

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 2

atgcttcatt cgctcacao ac

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:primer

<400> 3

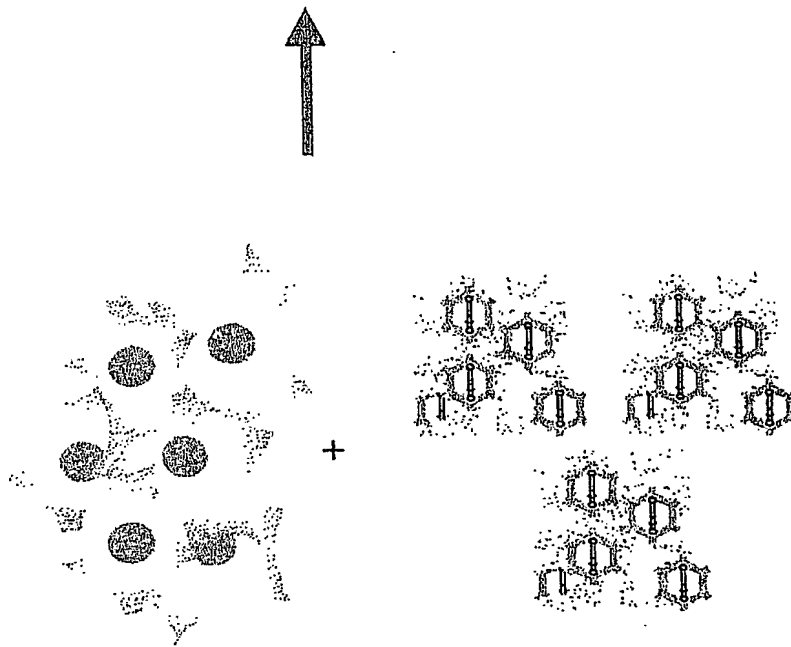
tctgtttggc ggccatattg a

21

【書類名】 図面
【図 1】

ラットの皮下移植

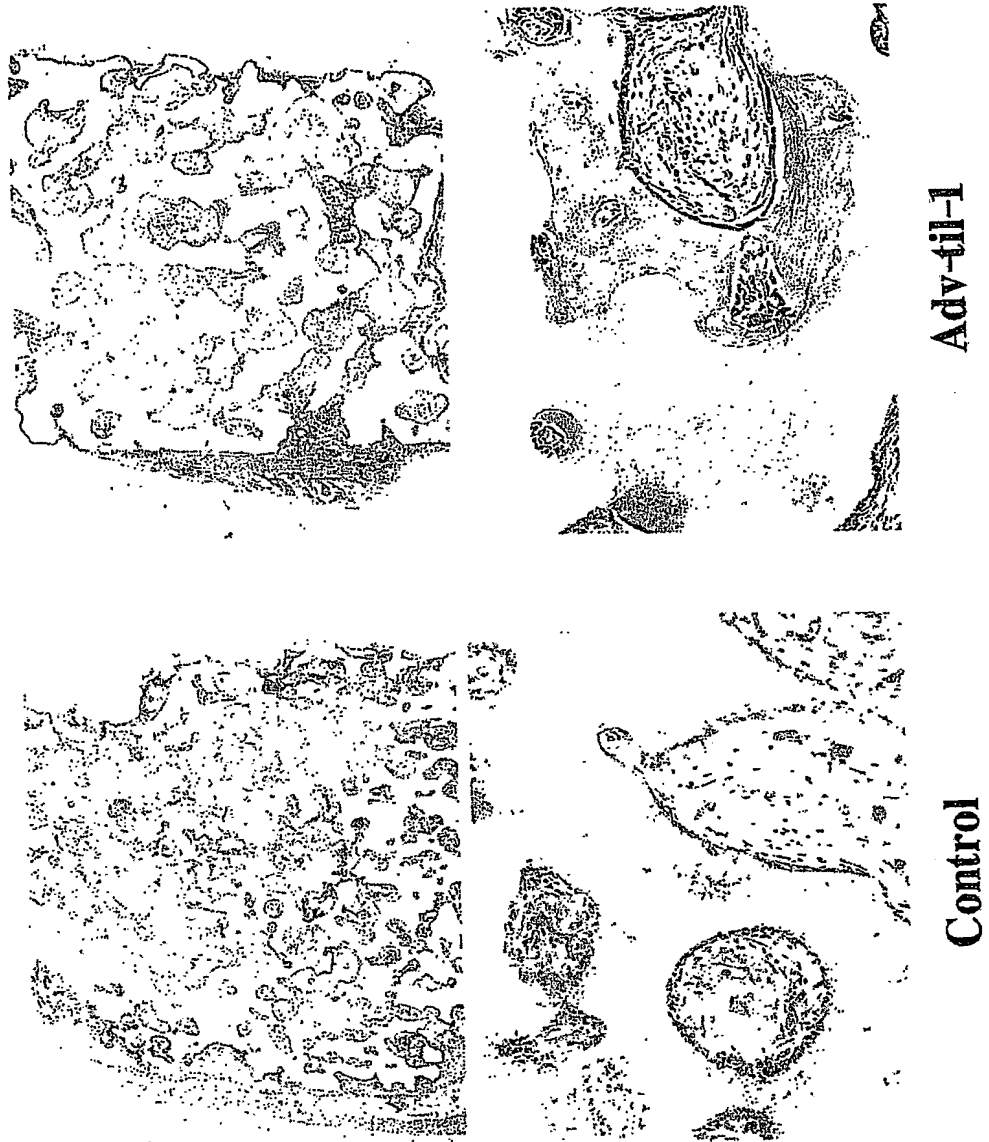
骨芽細胞様初代培養細胞 (ただし初期分化)



ウイルス吸着担体
(Adv-cbfa1)

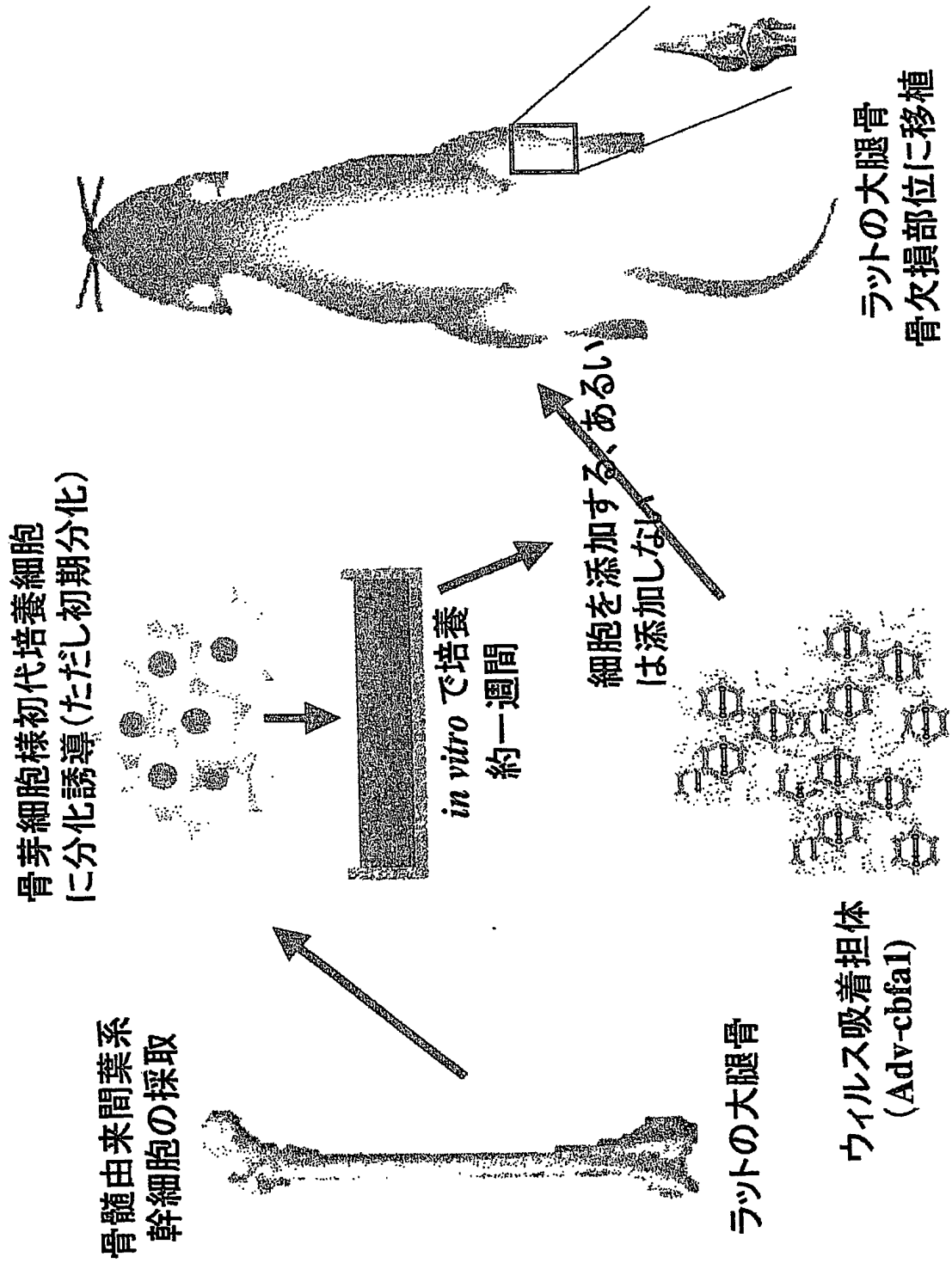
【図 2】

HE staining of β -TCP block after 3 week
subcutaneous implantation



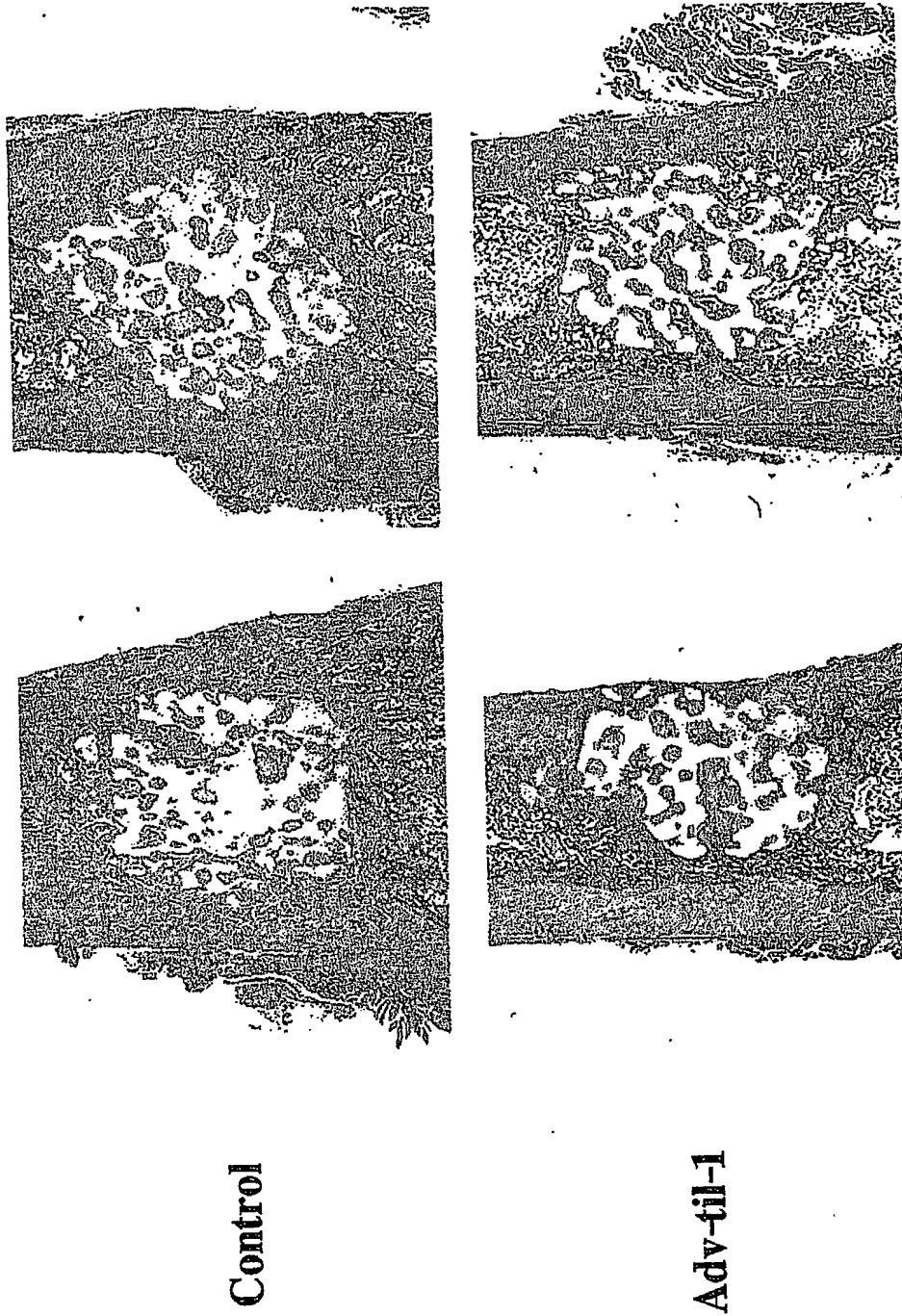
【図 3】

Schematic representation of cultured bone transplantation model



【図 4】

HE staining of β -TCP block in bone defect
model at 2 week postimplantation



Control

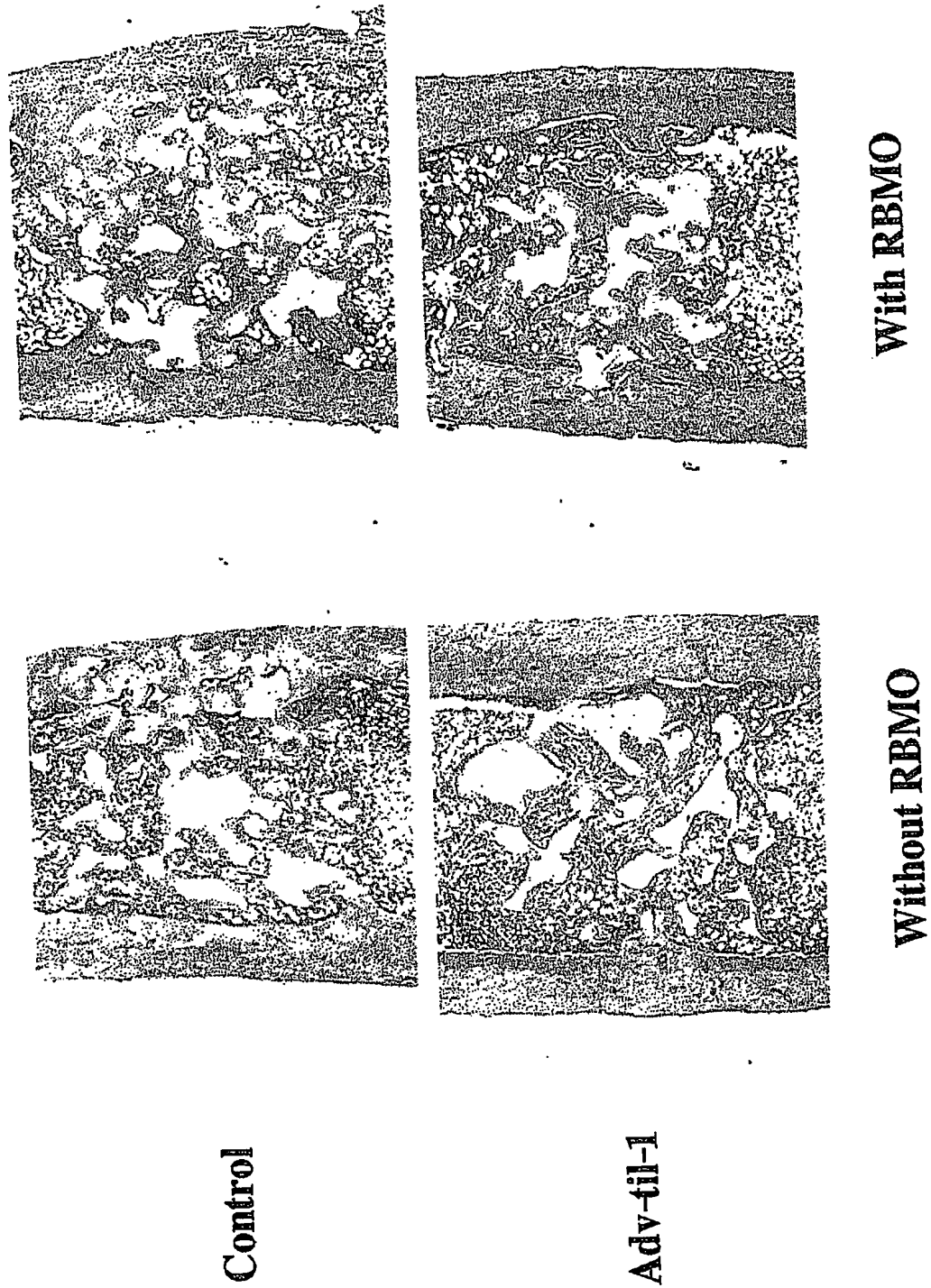
Adv-til-1

With RBMO

Without RBMO

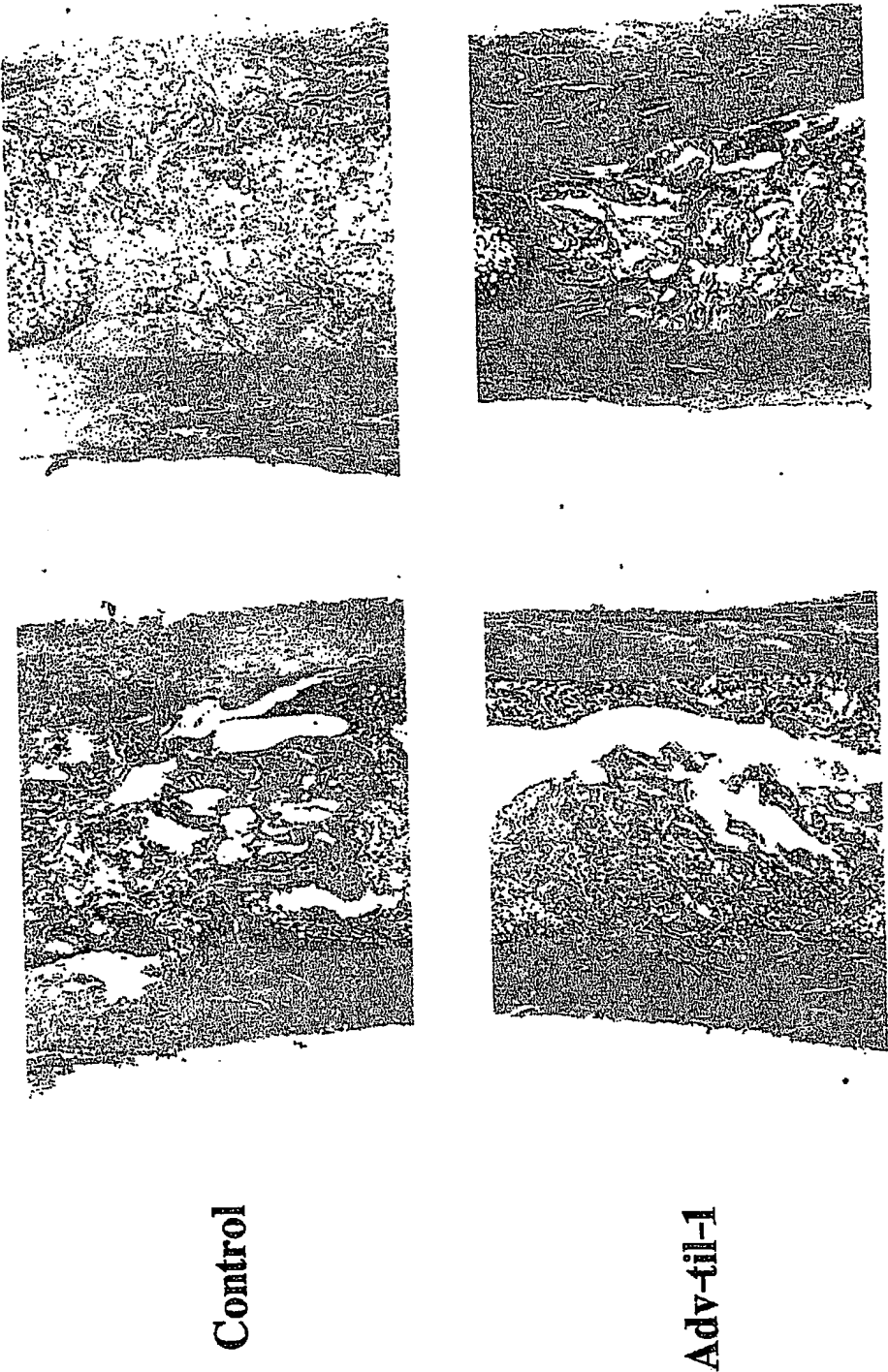
【図 5】

HE staining of β -TCP block in bone defect
model at 6 week postimplantation



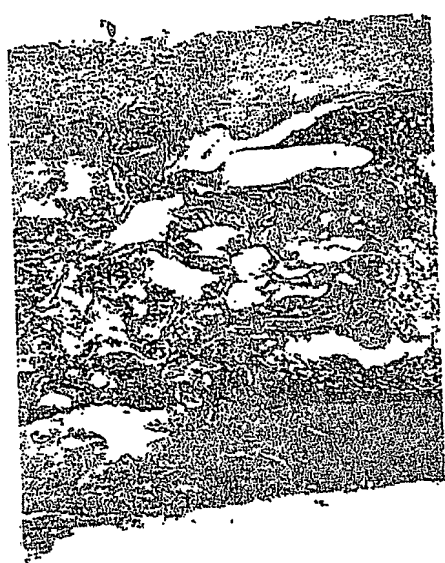
【図 6】

HE staining of HA block in bone defect model at 3 week
postimplantation



【図 7】

HE staining of blocks in bone defect model
at 3 week postimplantation



HA block



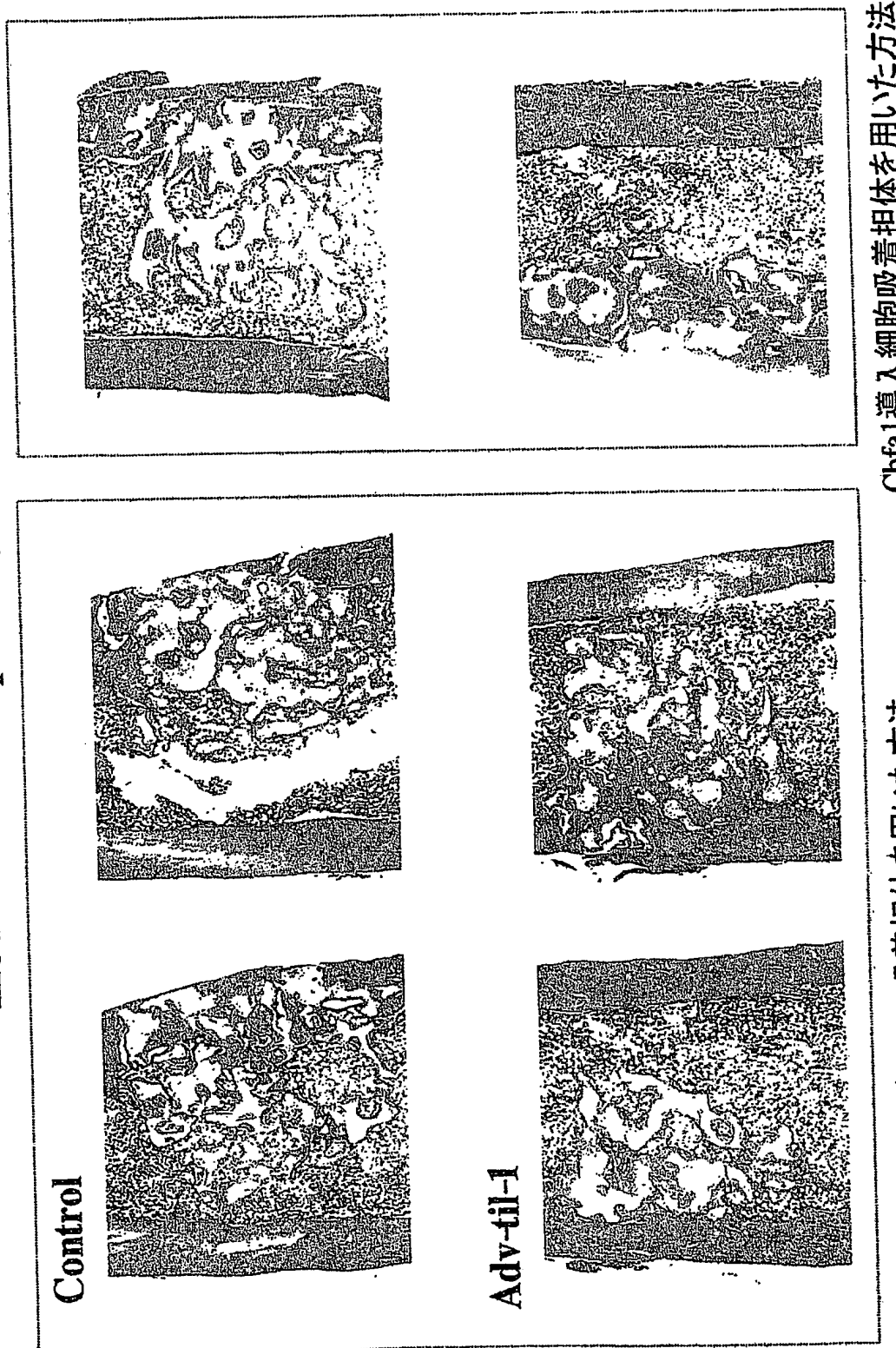
β -TCP block

Control

Adv-til-1

【図 8】

HE staining of β -TCP blocks in bone defect
model at 8 week postimplantation



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 歯科領域あるいは整形外科領域における、より安全かつ簡便な骨・軟骨再生のための手段を提供すること。

【解決手段】 骨・軟骨誘導性転写因子の遺伝子を導入したウイルスを含む生体適合性材料からなるインプラント。

【選択図】 なし

特願 2003-355505

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構

2. 変更年月日

2004年 4月 1日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人科学技術振興機構

特願 2 0 0 3 - 3 5 5 5 0 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[3 0 1 0 2 1 5 3 3]

1. 変更年月日

2 0 0 1 年 4 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所